

基于多测点 LA-ICPMS 的耳石核区元素 指纹分析技术及其在鱼类群体 识别中的实证研究*

窦硕增¹ 天野洋典² 于鑫^{1,3} 曹亮¹ 白井厚太郎²
大竹二雄² 塚本勝巳⁴

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 2. 东京大学大气海洋研究所
大槌国际沿岸海洋研究中心 岩手县大槌町 028-1102; 3. 中国科学院研究生院 北京 100049;
4. 东京大学大气海洋研究所 千叶县柏市 277-8564)

摘要 构建了多测点激光剥蚀取样(LA)-ICPMS 元素分析-剥蚀点显微结构验证的耳石核区元素指纹分析技术, 以此进行了五个刀鲚群体(辽东湾、渤海湾、黄河口、胶州湾及长江口群体)识别的实证研究。结果发现, 耳石核区 Sr : Ca 和 Ba : Ca 比值是有效识别各地理群体的元素指纹, 基于二者的各群体判别成功率在 46.2%—92.3% 之间, 总体判别成功率为 72.7%, 表现出其较强的群体识别能力。借助于耳石内的放射状标志带结构特征可较准确地识别耳石核区, 保证了激光剥蚀点的精准定位及剥蚀取样的质量和代表性; 对激光剥蚀点的显微结构验证可以消除无效剥蚀点的元素测定数据对元素指纹分析产生的误差; 刀鲚的定居性、溯河性等生活特性降低了各群体混合几率和环境因素对耳石核区微化学组成的影响, 使得耳石核区元素指纹具备高稳定性和特质性。这些研究技术的改进和刀鲚的生理生态特性提高了该技术识别各地理群体的准确性和效率。

关键词 耳石, 微化学, 刀鲚, 群体识别, 激光剥蚀, 质谱分析

中图分类号 Q179.3

耳石元素指纹分析(elemental fingerprinting)是指利用元素分析方法确立耳石中能有效表征鱼类特定生活阶段所特有的微化学组成, 即元素指纹或元素标识, 以此重新构建或反演鱼类的生活史和环境史中相关问题。现有文献报道过的耳石指纹元素主要包括 Mg、Zn、Sr、Ba、Mn、Pb、Fe、Cu、Cd、Ni、S 等十几种元素(Edmonds *et al.*, 1991; Secor *et al.*, 1995a, b; Thorrold *et al.*, 1998; Campana, 1999; Thresher, 1999; Campana *et al.*, 2001; Elsdon *et al.*, 2008)。主要元素测定方法为电感耦合等离子体质谱分析(包括同位素稀释 ID-ICPMS 和激光剥蚀 LA-ICPMS)。ID-ICPMS 分析是全耳石酸溶分析, 样品准备简单易操作, 元素检

测限低, 能客观反映鱼类从出生到被采捕整个生活期间所经历的总体环境状况, 通常用于仔幼鱼种群判别和混合群识别等问题, 但它无法揭示鱼类特定生活阶段的环境履历(Thorrold *et al.*, 1998; Campana *et al.*, 2000; Gillanders, 2002; Humphreys Jr *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2010)。LA-ICPMS 分析可测定特定耳石区(如耳石核区或年轮区)的微化学组成或解析整个耳石断面上微量元素随鱼类生长的连续分布特征, 所以它能揭示鱼类整个生活过程或特定生活阶段所经历的水环境变化, 通常应用于仔鱼转输和分散、洄游迁移、生活史和环境史重建等研究(Fowler *et al.*, 1995; Campana, 1999; Thresher, 1999)。耳石核区形成于鱼

* 国家自然科学基金项目资助, 40676086 号, 40976084 号, 41121064 号。窦硕增, 博士, 研究员, E-mail: szdou@qdio.ac.cn
收稿日期: 2011-09-24, 收修改稿日期: 2011-10-25

类孵化时期,其元素组成可反应出生地的水化学特征。所以,耳石核区元素指纹的 LA-ICPMS 分析是揭示鱼类混合群体识别、出生溯源(stock identity)、群体贯通性(stock connectivity)与出生地回归(homing)等鱼类生态学难点问题的关键技术(Campana *et al.*, 1994; Thorrold *et al.*, 2000; Brophy *et al.*, 2003; Gillanders *et al.*, 2005; Stransky *et al.*, 2005)。

准确定位耳石核区并有效激光剥蚀测试样品是获得可靠的元素指纹 ICPMS 分析结果的关键技术。受耳石内部形态结构及切片技术限制,加之激光剥蚀定位取样时一般是通过反射光显微镜获取的耳石结构的计算机图像,相对于透射光图像比较模糊,在耳石核区准确定位激光剥蚀取样在实际操作过程中常常存在一定的困难。而传统的单点剥蚀取样技术(即每个耳石只在核区一点剥蚀取样测试其元素组成)会因取样点的单一性和偏差而降低指纹元素分析的可靠性。这就要求研究者在开展相关研究时,应根据耳石结构特征,改进并确立一种合适的元素测试方法,以提高耳石指纹元素分析的准确性及其应用能力。

与过去研究中采用的单点激光剥蚀取样方法不同,本研究提出了耳石核区的多测点激光剥蚀(LA)取样-ICPMS 元素分析-剥蚀点显微结构验证的技术方法。作为实证研究,作者采用这一方法研究了我国五个刀鲚(*Coilia nasus*)地理群体的耳石核区的元素组成及其差异,确立能有效鉴别各刀鲚群体的耳石元素指纹及量化基准,以此验证该方法的有效性和可行性。另外,本文利用该技术方法对比研究了 1985 年和 2008 年在长江口水域采集的刀鲚个体的耳石微化学组成,探讨 20 多年来其元素指纹的变化特征。

近年来,国内关于鱼类耳石形态特征和显微结构方面的研究(叶振江等, 2007; 郭弘艺等, 2007; 王英俊等, 2010; 葛珂珂等, 2010; 黎雨轩等, 2010),也有少量关于耳石微化学方面的初步研究报道(高永文等, 2004; 杨良锋等, 2006; 高永华等, 2007; 窦硕增, 2007; 杨健等, 2010; 窦硕增等, 2011; Yang *et al.*, 2006), 尚未有基于 ICPMS 的耳石指纹元素分析的鱼类种群识别的研究报道。鉴于耳石元素分析及元素测定值的数据分析方法中存在诸多特别需要注意的技术细节问题,而目前尚无详细的中文文献供参考,本文以基于耳石核区元素指纹的刀鲚群体识别研究为实例,在简要报道该研究的结果的同时,着重分析相关研究方法的技术细节问题,梳理和探讨了一些相关的重要科学问题并尽量全面地附注代表性文献,以

方便国内同行参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本研究所用一部分耳石样本取自中国科学院海洋研究所于 1983 年在辽东湾(辽河口, 左矢耳石, 13 个; 鱼体体长范围, 279—402mm; 下同)、渤海湾(海河口, 12 个; 299—404mm)、黄河口(13 个; 270—387mm)、胶州湾(大沽河口, 15 个; 287—385mm)及 1985 年在长江口水域(15 个; 262—372mm)采集的五个刀鲚群体中的产卵后个体。另一部分耳石样本取自 2008 年在长江口水域(与 1985 年的取样地点一致)采集的刀鲚产卵后个体(15 个; 245—330mm)。耳石均保存在塑料耳石盒中并有对应的鱼类被捕获时的个体生物学测定记录。进行元素分析前,耳石均经过超声波清洗除污、干燥、树脂包埋、固定后在 Struers Discoplan-TS 上切割、研磨,制作成耳石核区充分暴露、厚度 400—600 μm 的切片,然后在 Struers Roto-pol-35 上抛光、超声波清洗除污、干燥后备用。

1.2 方 法

耳石元素分析在 Merchantek 激光剥蚀进样系统(UP-213 Nd: YAG UV-LA; New Wave Research)和 Agilent 7500s ICPMS (Agilent Technologies)上进行。激光剥蚀定点取样、进样及 ICPMS 元素分析、数据采集和处理等均通过设备配置的标准操作方法和计算机软件系统分批进行。在本研究中,每批置入激光剥蚀灶的样品包括从每个群体中随机取出的 12 个耳石切片及一个 NIST612 标样(National Institute of Standards and Technology, USA),元素测试按 NIST612-耳石样品-NIST612 顺序循环进行。NIST612 用于校正 ICPMS 元素分析过程中的仪器测定误差,每次一点激光剥蚀取样。每个激光剥蚀点直径 40 μm ,深度 15 μm ,时间 15s。在每个耳石样品上则连续五点测样,即在耳石核的中心区(一点)及半径 100 μm 的周边轴线上(四点)连续取样。激光剥蚀点定位通过配置在 LA 系统的反射光显微镜在计算机上的成像系统控制完成。激光剥蚀的样品通过 Ar 和 He 混合气体送入 ICPMS 进行元素分析。以时间函数方式采集数据,测定的各元素值以其浓度与 Ca^{2+} 浓度的比值表示,以每个耳石样品的五点元素值的平均值表示其元素组成。在无任何样品条件下对 Ar、He 混合气体进行 LA-ICPMS 测试,以确定元素检测限水平。样品测试前都要对激光剥蚀灶进行 90s 清除操作以防测试

样品污染影响耳石元素测试分析的精度。利用扫描电镜(SEM, Keyence VE-8800)对分析完毕的耳石样品的激光剥蚀点进行 SEM 检测, 去除无效激光剥蚀样品, 以减小测量误差对数据分析的影响。

元素值数据分析时, 先根据各元素的最低检测限(Lowest detection limit)等指标评价元素测定值的有效性, 去除无效元素, 只对在所有耳石个体中均被检测出的有效元素的元素值做数据分析。在统计分析时, 先检验各耳石元素的元素值的组内正态分布性(Kolmogorov-Smirnov 检验)和组间方差齐次性(Levene's 检验), 对满足上述两个条件的元素值进行单因素 ANOVA 分析。依据不同群体间各耳石元素值之间的差异显著性, 确定能有效表征不同群体的耳石元素指纹。对群体间各元素值分别进行 ANOVA 和 ANCOVA(地理群体为独立变量, 鱼类个体体长为协同变量)分析, 检验各耳石的元素组成是否受体长效应变化影响。对所有群体的元素值进行判别分析(Discriminant function analysis), 依据判别成功率(Cross-validated discrimination)检验耳石元素指纹在群体划分中的可靠性。统计分析的显著性差异水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 耳石核区样品激光剥蚀的准确定位与指纹元素的识别分析

准确定位耳石核区并有效地激光剥蚀测试样品是获得可靠有效元素指纹的关键。刀鲚耳石核区形态结构清晰, 尤其是耳石内部存在围绕耳石核自中心自至边缘区呈放射状的标志带(图 1)。这一形态特征有利于耳石核中心激光剥蚀取样点的准确定位。其它 4 个激光剥蚀点分别均匀分布在距离耳石核中心 $100\mu\text{m}$ 的核区四个轴线方向上, 即五个取样点均分布在耳石核区。由于耳石核形成于鱼类出生期间, 这

五点样品的测定元素值的平均值可以客观反映耳石核区的元素组成, 能有效表征鱼类个体出生地的水化学特征。对耳石切片进行的显微结构检验表明, 所有测试样品的各激光剥蚀点定位准确、剥蚀取样有效, 证明本研究采用的多测点激光剥蚀技术是有效可行的(图 1)。理论上, 与单点激光剥蚀取样相比, 该技术的剥蚀取样点应具有更高的代表性和可靠性。

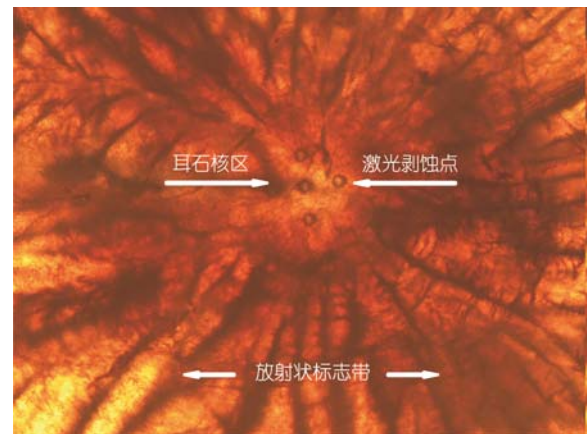


图 1 刀鲚耳石切片的内部形态结构及在耳石核区的多点激光剥蚀精确定位与取样的透射光图像

Fig.1 Photographs showing the transmitted light microstructure and checking of the multiple laser ablations on an otolith section of the tapertail anchovy

元素值数据统计分析的一个关键问题是准确识别有效耳石元素, 去除无效元素干扰, 以提高元素指纹分析精度。LA-ICPMS 分析在五个刀鲚群体的耳石核区检测和识别出 5 种有效元素: Na、Mg、K、Sr 和 Ba。它们的最低检测限分别为 0.2170 、 0.0017 、 0.1070 、 0.0046 和 0.0002mmol/mol , 远低于耳石核区的各元素比测定值(表 1)。各元素的测定比值满足本研究中各统计分析所需要的组内正态分布性和组间方差齐次性条件。ANOVA 结果表明, 各群体间个体耳石内的 Na : Ca、Sr : Ca 和 Ba : Ca 比值存在显著差异($P <$

表 1 五个刀鲚群体的耳石核区微量元素比值及其群体间统计分析结果

Tab.1 Concentration ratios and ANOVA results of the five elements in the otolith nuclei of tapertail anchovy collected in five Chinese estuaries

元素比种类	元素比值(mmol/mol)					P 值
	辽东湾群体	渤海湾群体	黄河口群体	胶州湾群体	长江口群体	
Sr : Ca	0.94 ± 0.40^a	2.41 ± 0.54^b	3.11 ± 0.33^c	2.73 ± 0.21^d	0.73 ± 0.09^a	$P < 0.001$
Ba : Ca	0.02 ± 0.00^a	0.04 ± 0.01^b	$0.02 \pm 0.01^{a,c}$	$0.03 \pm 0.02^{b,c}$	0.04 ± 0.01^b	$P = 0.001$
Na : Ca	19.85 ± 0.05	19.85 ± 0.04	19.88 ± 0.06	19.90 ± 0.07	19.77 ± 0.06^a	$P < 0.001$
K : Ca	2.38 ± 0.54^a	$2.54 \pm 0.51^{a,b}$	$2.50 \pm 0.56^{a,b}$	2.79 ± 0.43^b	$2.56 \pm 0.52^{a,b}$	$P = 0.378$
Mg : Ca	0.21 ± 0.07^a	$0.25 \pm 0.05^{a,b}$	$0.26 \pm 0.13^{a,b}$	$0.23 \pm 0.13^{a,b}$	0.29 ± 0.06^b	$P = 0.280$

注: 表中数值表示 mean \pm S.D.; 不同上标表示各元素比值在群体间差异显著($P < 0.05$)

0.05)。其中 Sr : Ca 和 Ba : Ca 比值在多数群体之间均存在显著差异,是有效表征不同地理群体的元素指纹。但是,耳石内 K : Ca 和 Mg : Ca 比值在各群体间差异不显著($P>0.05$; 表 1)。耳石内各元素的测定比值受鱼体体长效应的影响不显著(ANCOVA, $P>0.05$)。基于这一发现,作者判定利用多测点 LA-ICPMS 研究不同大小刀鲚个体的耳石核区元素指纹是有效的。

由于 K、Na 在耳石内的沉积过程极易受环境因素和鱼类个体生理状况影响,加之在耳石保存或研磨制作切片过程中容易流失,一般不用于耳石元素指纹分析。因此,通常不作为独立变量被纳入元素指纹的判别分析。本研究对其它三种测定元素值的全独立变量(Entering independent together method)判别分析结果表明,刀鲚的耳石核区的 Sr : Ca 和 Ba : Ca 比值对群体间差异的贡献值最大。判别函数 F_1 (特征值=9.31)能有效地把辽东湾群体、长江口群体与其它群体区分开来,也基本可以区分黄河口群体和渤海湾群体,并解释了 95.7%的群体差异。判别函数 F_2 (特征值=0.37)能有效区分辽东湾群体和长江口群体,但只能解释 3.8%的群体差异(图 2)。两个判别函数分值的总体判别成功率为 72.7%,在各群体内的判别成功率分别为:辽东湾群体(92.3%)、长江口群体(86.7%)、黄河口群体(76.9%)、渤海湾群体(58.3%)及胶州湾群体(46.2%)。在地理位置相互独立的群体中,长江口群体中被误判的 2 个体全部被归类于辽东湾群体,胶州湾群体中被误判的 7 个体则被归类于渤海湾群体(4)和黄河口群体(3)。而在地理上相邻的渤海湾群体和黄河口群体中,被误判的共 8 个体中除 1 个渤海湾个体被归类于黄河口群体、1 个黄河口个体被归类于渤海湾群体外,其它 6 个体分别被归类于地理位置较远的

胶州湾群体(4)和长江口群体(2)。这些结果表明各刀鲚群体中误判的个体并不一定都是被归类到相邻的地理群体中。

即使同一水域的同一种鱼类个体,其耳石元素指纹也可能存在显著的年间差异或随生活环境的长期变迁而发生显著变化(Campana *et al.*, 1994)。在本研究中,2008 年在长江口水域采集的刀鲚样本的耳石核区的 Sr : Ca、K : Ca 比值或 Mg : Ca、Ba : Ca 比值分别显著高于或低于该水域 1985 年样本的耳石微量元素比值(ANOVA, $P<0.005$; 表 2)。四种元素比值的任意两变量分布图基本上可以直观有效地识别这两批样本,以 Sr :

Ca 比值与任一其它微量元素比值的识别效果最显著(图 3)。这表明,尽管长江口水域刀鲚的耳石微量元素种类保持不变,其元素指纹(各耳石微量元素与 Ca 的比值)在过去 20 多年里已经发生了显著变化。目前尚没有充分的科学证据来解释产生这一变化现象的原因,但将来至少可以从以下几

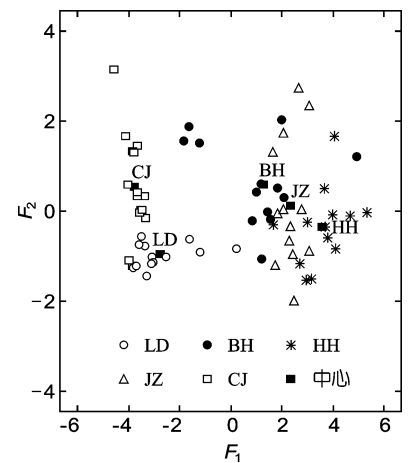


图 2 五个刀鲚群体的耳石核区元素比值的判别分析结果

Fig.2 Scatter-plot of the scores of first two discriminant functions for elemental fingerprints of each of the five tapertail anchovy stocks

LD. 辽东湾群体, BH. 渤海湾群体, HH. 黄河口群体, JZ. 胶州湾群体, CJ. 长江口群体

表 2 1985 年和 2008 年长江口水域刀鲚个体的耳石核区微量元素比值及统计分析结果

Tab.2 Results of one-way ANOVA running on the five elemental concentration ratios in the otolith nuclei of tapertail anchovy collected in the Yangtze River estuary in 1985 and 2008

元素比种类	样品采集时间	元素比值(mmol/mol)	n	SS	df	MS	F	P
Na : Ca	1985	19.77±0.062	15	0.008	1	0.008	3.786	0.062
	2008	19.80±0.017	15		1			
Mg : Ca	1985	0.286±0.056	15	0.040	1	0.040	12.397	0.003
	2008	0.215±0.058	15		1			
K : Ca	1985	2.569±0.523	15	15.890	1	15.890	22.928	<0.001
	2008	4.025±1.055	15		1			
Ba : Ca	1985	0.036±0.014	15	0.006	1	0.006	54.964	<0.001
	2008	0.008±0.003	15		1			
Sr : Ca	1985	0.734±0.095	15	24.867	1	24.867	320.437	<0.001
	2008	1.555±0.382	15		1			

注:表中元素比值表示平均值±S.D.

个层面进一步探讨这一问题。其一, 过去 20 年来长江流域人类活动(如过度捕捞、污染及水利工程建设)的加剧正显著地改变着该水域的生态环境。显而易见, 水化学-物理环境(如水化学组成、水温、盐度)和生物

环境(如饵料基础)的变化会直接影响出生并生活于该水域的刀鲚的耳石微化学组成。其二, 由于一些大型水利工程建设通常无法提供合适的鱼道以保证如刀鲚这类的洄游性鱼类进行正常的产卵洄游, 导致其在长江中上游的传统产卵场或出生地减少甚至逐渐消失, 并呈向长江下游或河口区集中分布的趋势。出生地和育幼场的长期变迁或消失会引起刀鲚繁殖、发育生长及溯、降河过程等生理生态过程的演变。刀鲚生活史的演变无疑会对水体内的微量元素在其耳石内的沉积量和沉积方式即元素指纹的变化产生深刻的影响。另外, 尽管本研究结果表明长江口水域刀鲚耳石核区内微化学组成在过去的 20 年间变化显著, 但其是否存在显著的年间变化以及这些变化会在多大程度上影响本研究中的两批样本的耳石核区微化学组成结果, 尚有待进一步研究。

2.2 耳石元素指纹分析在鱼类群体识别中的应用及其影响变量
耳石元素指纹可有效地应用于一些鱼类的地理群体判别、出生溯源或混合群体识别等研究, 但判别成功率在不同研究中存在较大差异(Campana *et al*, 1994, 2000; Thorrold *et al*, 1998; Brophy *et al*, 2003; Gillanders *et al*, 2005; Humphreys Jr *et al*, 2005; Stransky *et al*, 2005; Longmore *et al*, 2010)。耳石元素指纹研究除了本文已引用的文献外, 四次国际耳石学术会议也集中发表了诸多相关研究(Secor *et al*, 1995a; Fossum *et al*, 2000; Begg *et al*, 2005; Miller *et al*, 2010)。现有文献中基于 ICPMS 的耳石元素指纹的鱼类群体判定成功率在 40%—95% 之间。其中在一些鱼类如美洲鲌(*Alosa sapidissima*)和圆吻突吻鲱(*Coryphaenoides rupestris*)的不同地理群体中的总体判别成功率高

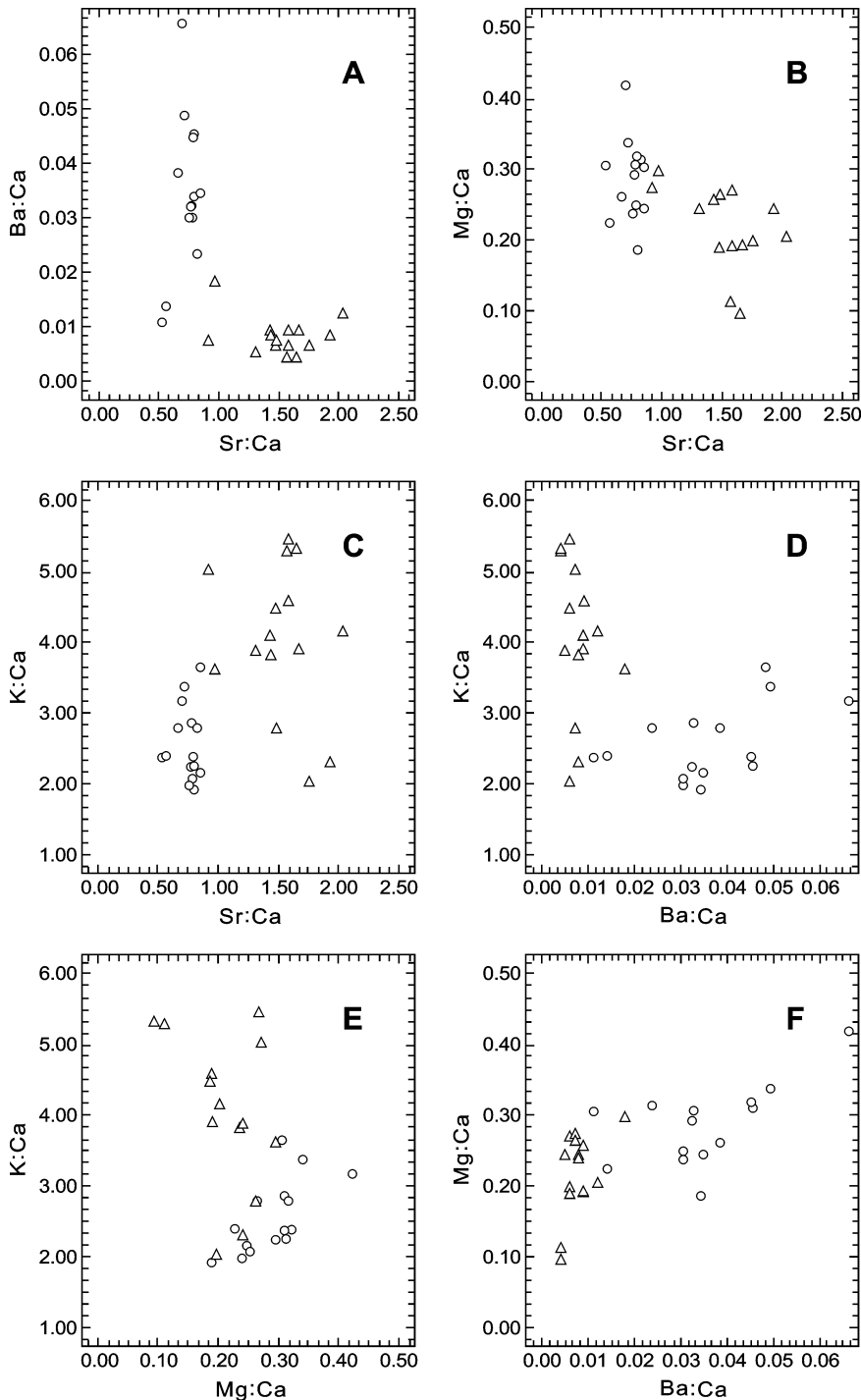


图 3 1985 年和 2008 年长江口水域刀鲚个体的耳石核区微量元素比值(mmol/mol)的群体识别效果

Fig.3 Scatter-plots of concentration ratios (mmol/mol) of the four elements in the otolith nuclei of tapertail anchovy collected in the Yangtze River Estuary in 1985 and 2008
1985 年, 2008 年

达 90% 以上(Thorrold *et al.*, 1998; Longmore *et al.*, 2010)。本研究中五个刀鲚群体的总体判别成功率为 72.7%，其中有三个群体的判别成功率在 75% 以上。与文献中其它鱼类相比，本研究中刀鲚的判别成功率是较高的。

除激光剥蚀点定位及 ICPMS 技术测定精度可能引起元素测定误差外，其它因素的变化也会显著影响耳石元素指纹组成及其群体判别成功率。如前所述，群体混合现象直接关系到测试样本的代表性和有效性，从而影响耳石元素指纹的群体判别成功率。另外，尽管现有的文献在水温、盐度及水化学环境因素等与耳石元素指纹组成的关系问题上因实验条件或鱼种而异，但这些因素对耳石元素指纹组成产生的影响是不可忽视的(Kalish, 1989; Fowler *et al.*, 1995; Tzeng, 1996; Gallahar *et al.*, 1996; Bath *et al.*, 2000; Elsdon *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2006; Collingsworth *et al.*, 2010; DiMarina *et al.*, 2010)。刀鲚是定居性强的溯河性鱼类，通常在母河河口区育幼和索饵(袁传宓, 1987; 窦硕增等, 2011)，这在很大程度上降低了各地理群体混合的几率，提高了本研究中的刀鲚样本的群体代表性，从而降低了因为群体混合导致个体误判的风险。刀鲚在一定水温范围内产卵于江河淡水中，产卵场的水化学组成在产卵期内相对稳定，这也会在一定程度上降低水温、盐度及水化学等环境因素的变化对特定地理群体内个体耳石核区元素指纹组成的影响。另一方面，不同江河都具有独特的水化学组成，这为各地理群体形成特有的耳石核区元素指纹提供了有利的条件。同一群体的刀鲚耳石核区的元素指纹存在一定的个体差异，但并不显著，表明至少在小尺度时间水平上鱼类个体生长差异并不显著改变耳石核区的元素指纹。刀鲚的定居性和溯河性特点使得其耳石核区元素指纹具有高稳定性和独特性特征，有利于获得较高的群体识别成功率，能客观反映耳石核区的元素指纹分析在群体判定中的应用水平。

本研究证实了作者构建的多测点激光剥蚀取样(LA)-ICPMS 元素分析-剥蚀点显微结构验证的耳石核区元素指纹分析在刀鲚群体判别中是有效可行的。但限于 ICPMS 采集数据方法的复杂性，本研究未对该方法与单测点 LA-ICPMS 元素指纹分析方法对比研究。另外，由于缺少相应的母河产卵场的水环境现场信息资料，本研究尚无直接证据检验刀鲚的耳石核区元素指纹是否可以作为反演其母河水环境特征的天然标记。以后开展研究时，在同步收集与分析耳

石样本与水环境样本的同时，应对同一鱼类个体的两个耳石分别做单测点和多测点 LA-ICPMS 耳石核区元素指纹分析，以便相互验证，探索利用耳石元素指纹反演水环境和鱼类出生地回归等科学问题的技术方法。

近年来，有学者已经开始同步运用耳石信息技术(如耳石形态学、显微结构 SEM、微化学 EPMA 和 ICPMS、稳定同位素比值分析等)和生物技术(如种群遗传学)研究一些鱼类生态学难点问题如混合群体识别、群体贯通性、出生溯源、出生地回归、生活史和环境史重建等，这些研究为构建综合运用这些方法解决鱼类生活史和环境史重建中难点问题的技术方法提供了研究实例和参考(Gillanders, 2002; Longmore *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2010)。这是未来耳石信息分析技术及其应用研究领域的一个潜在研究热点，值得国内学者关注。

参 考 文 献

- 王英俊, 叶振江, 刘 群等, 2010. 细条天竺鱼(*Apogonichthys lineatus*)与黑鳃天竺鱼(*A. arafurae*)耳石形态识别的初步研究. 海洋与湖沼, 41(2): 282—285
- 叶振江, 孟晓梦, 高天翔等, 2007. 中日两种花鲈(*Lateolabrax sp.*)耳石形态的地理变异. 海洋与湖沼, 38(4): 356—360
- 杨 健, 刘洪波, 2010. 长江口崇明水域鳊鱼耳石元素微化学分析. 中国水产科学, 17: 853—858
- 杨良锋, 李胜荣, 罗军燕等, 2006. 不同水域鲤鱼耳石微化学特征及其环境指示意义. 岩石矿物学杂志, 25: 511—517
- 袁传宓, 1987. 刀鲚的生殖洄游. 生物学通报, (12): 1—3
- 高永文, 鲁安怀, 宋玉国, 2004. 鱼耳石的碳、氧稳定同位素成分研究. 自然科学进展, 14: 268—272
- 高永华, 李胜荣, 冯庆玲等, 2007. LA-ICP-MS 方法在鲤鱼耳石微区研究中的应用矿物岩石. 地球化学通报, 26(增刊): 92—94
- 郭弘艺, 唐文乔, 魏 凯等, 2007. 中国鲚属鱼类的耳石形态特征. 动物学杂志, 42(1): 39—47
- 葛珂珂, 钟俊生, 2010. 长江口沿岸碎波带刀鲚仔稚鱼的日龄组成与生长. 水生生物学报, 34: 716—721
- 窦硕增, 2007. 鱼类的耳石信息分析及其生活史重建——理论、方法及应用. 海洋科学集刊, 48: 93—112
- 窦硕增, 横内一樹, 于 鑫等, 2011. 基于 EPMA 的耳石 Sr : Ca 比分析及其在鱼类生活履历反演中的应用实例研究. 海洋与湖沼, 42(4): 512—520
- 黎雨轩, 何文平, 刘家寿等, 2010. 长江口刀鲚耳石年轮确证和年龄与生长研究. 水生生物学报, 34: 787—793
- Bath G E, Thorrold S R, Jones C M *et al.*, 2000. Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64: 1705—1714

- Begg G A, Campana S E, Fowler A J *et al*, 2005. Proceedings of the third international symposium on otolith research and application. *Marine and Freshwater Research*, 56: 477—814
- Brophy D, Danilowicz B S, Jeffries T E, 2003. The detection of elements in larval otoliths from Atlantic herring using laser ablation ICP-MS. *Journal of Fish Biology*, 63: 990—1007
- Campana S E, 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 188: 263—297
- Campana S E, Chouinard G A, Hanson J M *et al*, 2000. Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research*, 46: 343—357
- Campana S E, Fowler A J, Jones C M, 1994. Otolith elemental fingerprinting for stock identification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using laser ablation ICPMS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51: 1942—1950
- Campana S E, Thorrold S R, 2001. Otoliths, increments and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58: 30—38
- Collingsworth P D, van Tassell J J, Olesik J W *et al*, 2010. Effects of temperature and elemental concentration on the chemical composition of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67: 1187—1196
- DiMarina R A, Miller J A, Hurst T P, 2010. Temperature and growth effects on otolith elemental chemistry of larval Pacific cod, *Gadus macrocephalus*. *Environmental Biology of Fishes*, 89: 453—462
- Edmonds J S, Caputi N, Morita M, 1991. Stock discrimination by trace element analysis of otoliths of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*), a deep water marine teleost. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 42: 383—389
- Elsdon T S, Gillanders B M, 2002. Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59: 1796—1808
- Elsdon T S, Wells B K, Campana S E *et al*, 2008. Otolith chemistry to describe movements and life history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanography and Marine Biology-Annual Review*, 46: 297—330
- Fossum P, Kalish J, Moksness E, 2000. Proceedings of the second international symposium on fish otolith research and application. *Fisheries Research*, 46: 1—371
- Fowler A J, Campana S E, Thorrold S R, 1995. Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using laser ablation ICPMS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 1431—1441
- Gallahar N K, Kingsford M J, 1996. Factors influencing Sr/Ca ratios in otoliths of *Girella elevata*: An experimental investigation. *Journal of Fish Biology*, 48: 174—186
- Gillanders B M, 2002. Temporal and spatial variability in elemental composition of otoliths: implications for determining stock identity and connectivity of populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59: 669—679
- Gillanders B M, Joyce T C, 2005. Distinguishing aquaculture and wild yellowtail kingfish via natural elemental signatures in otoliths. *Marine and Freshwater Research*, 56: 693—704
- Humphreys Jr R L, Campana S E, DeMartini E E, 2005. Otolith elemental fingerprints of juvenile Pacific swordfish *Xiphias gladius*. *Journal of Fish Biology*, 66: 1660—1670
- Kalish J M, 1989. Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 132: 151—178
- Longmore C, Fogarty K, Neat F *et al*, 2010. A comparison of otolith microchemistry and otolith shape analysis for the study of spatial variation in a deep-sea teleost, *Coryphaenoides rupestris*. *Environmental Biology of Fishes*, 89: 591—605
- Martin G B, Wuenschel M J, 2006. Effect of temperature and salinity on otolith element incorporation in juvenile gray snapper *Lutjanus griseus*. *Marine Ecology Progress Series*, 324: 229—239
- Miller J A, Wells B K, Sogard S M *et al*, 2010. Proceedings of the 4th international otolith symposium. *Environmental Biology of Fishes*, 89: 203—207
- Secor D H, Dean J M, Campana S E, 1995a. Recent developments in fish otolith research. University of South Carolina Press, Columbia S C, 1—735
- Secor D H, Henderson-Arzapalo A, Piccoli P M, 1995b. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192: 15—33
- Smith S J, Campana S E, 2010. Integrated stock mixture analysis for continuous and categorical data, with application to genetic-otolith combinations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67: 1533—1548
- Stransky C, Garbe-Schonberg C-D, Günther D, 2005. Geographic variation and juvenile migration in Atlantic redfish inferred from otolith microchemistry. *Marine and Freshwater Research*, 56: 677—691
- Thorrold S R, Jones C M, Campana S E *et al*, 1998. Trace element signatures in otoliths record natal river of juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Limnology et Oceanography*, 43: 1826—1835
- Thorrold S R, Shuttleworth S, 2000. *In situ* analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 1232—1242
- Thresher R E, 1999. Elemental composition of otoliths as a stock

- delineator in fishes. *Fisheries Research*, 43: 165—204
- Tzeng W N, 1996. Effects of salinity and ontogenetic movement on strontium:calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 199: 111—122
- Yang J, Arai T, Liu H *et al.*, 2006. Reconstructing habitat use of *Coilia mystus* and *Coilia ectenes* of the Yangtze River estuary, and of *Coilia ectenes* of Taihu Lake, based on otolith strontium and calcium. *Journal of Fish Biology*, 69: 1120—1135

MULTIPLE LASER ABLATIONS ON OTOLITH NUCLEI FOR ICPMS TO ELEMENTALLY FINGERPRINT FISH STOCKS: A CASE STUDY

DOU Shuo-Zeng¹, AMANO Hironori², YU Xin^{1,3}, CAO Liang¹, SHIRAI Kotaro²,
OTAKE Tsuguo², TSUKAMOTO Katsumi⁴

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. International Coastal Research Center, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Otsuchi-cho, Iwate 028-1102, Japan; 3. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 4. Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, Kashiwa-shi, Chiba 277-8564, Japan)

Abstract Elemental fingerprinting on otolith nuclei by laser ablation ICPMS (five laser ablations on the nucleus of each otolith) was conducted to delineate tapertail anchovy (*Coilia nasus*) stocks from five Chinese estuaries. Results showed that otolith Sr : Ca and Ba : Ca ratios were inter-site distinct enough to be used as natal tags for discriminating among geographical stocks with an overall classification accuracy rate of 75.8% (ranging from 61.5% to 84.6% for each stock by discriminant function analysis). Clear images of the concentric rays from the core outwards on the otolith sections could help us precisely locate the otolith core and conduct the five laser ablations. Subsequent microstructure checking confirmed that all the laser ablations were valid, which reduced the errors in elemental fingerprinting caused by potential invalid ablations and elemental data. The anadromous tapertail anchovy showed high fidelity to natal river for spawning and resided in the local estuary for growth, largely decreasing stock mixing throughout their life time. Meanwhile, the less varied environments in their birth rivers in the spawning season could reduce the ambient effects on the elemental uptake onto the otoliths and thus could produce relatively stable microchemistry composition in the otoliths. These ecological and physiological traits of the tapertail anchovy as well as the improvement of laser ablating method increased the accuracy and efficiency of elemental fingerprinting for stock discrimination obtained in the present study.

Key words Otolith, Microchemistry, Tapertail anchovy *Coilia nasus*, Stock discrimination, Laser ablation, Mass spectrometry